BIO-RAD

REF 31008

KALLESTAD™

L50325601ES00

Anti-dsDNA Microplate EIA

Manual de instrucciones

Para la detección cuantitativa o cualitativa de autoanticuerpos contra DNA de doble cadena (ds, por sus siglas en inglés) en suero o plasma humanos por enzimoinmunoensayo indirecto.

IVD

CE

Mfd. For *Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547, USA*

EC REP ***UK,*** *Bio-Rad Laboratories Europe Ltd., Perth*

CD en varios idiomas

Este kit incluye un CD-ROM en los siguientes idiomas:
inglés, alemán, francés, español, italiano, portugués, sueco, danés y griego.

Símbolos de la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro

CE • European Conformity • EG-Konformität • Conformité européenne • Conforme a la normativa europea • Conformità Europea • Conformidade com as normas europeias • Uppfyller EU-direktiv • CE-mærkning • Συμμόρφωση με τους Ευρωπαϊκούς κανονισμούς	 • Manufacturer • Hersteller • Fabricant • Fabricante • Produttore • Fabricante • Tillverkare • Producent • Κατασκευαστής	Mfd. For • Manufacturered for • Hergestellt für • Fabriqué pour • Fabricado para • Prodotto per • Fabricado para • Tillverkas för • Produceret for • Κατασκευάζεται για λογαριασμό της	EC REP • Authorized Representative in the European Union • Autorisierter Vertreter in der Europäischen Union • Représentant agréé pour l'Union Européenne • Representante Autorizado en la Unión Europea • Rappresentante autorizzato per l'Unione Europea • Representante Autorizado da União Europeia • Auktoriserad EU-representant • Autoriseret repræsentant i EU • Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Ένωση
LOT • Lot Number • Chargenbezeichnung • Numéro de lot • Número de lote • Numero di lotto • Número do lote • Batchnummer • Lotnummer • Αριθμός παρτίδας	 • Use by • Haltbar bis • Utiliser avant • Fecha de caducidad • Scadenza • Utilizar até • Användes före • Udløbsdato • Ημερομηνία λήξης	 • Temperature Limit • Temperaturgrenze • Limite de température • Límite de temperatura • Limite di temperatura • Limite de temperatura • Temperaturgränser • Temperaturområde • Όριο θερμοκρασίας	IVD • For In Vitro Diagnostic Use • In-vitro-Diagnostikum • Utilisation comme test de diagnostic in vitro • Para uso en diagnóstico in vitro • Per uso diagnostico in vitro • Para uso em diagnóstico in vitro • För in vitro-diagnostiskt bruk • Til in vitro-diagnostisk brug • Για in vitro διαγνωστική χρήση
 • Consult Instructions for Use • Gebrauchsanleitung beachten • Consulter la notice d'utilisation • Consulte las instrucciones de uso • Fare riferimento alle Istruzioni per l'uso • Consulte as instruções de utilização • Se bruksanvisning före användande • Se brugsvejledningen • Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	REF • Catalog Number • Katalognummer • Référence • Número de catálogo • Numero di catalogo • Número de catálogo • Katalognummer • Katalognummer • Αριθμός καταλόγου	CAL 0 • Calibrator 0 • Kalibrator 0 • Calibrateur 0 • Calibrador 0 • Calibratore 0 • Calibrador 0 • Kalibrator 0 • Kalibratorer 0 • Βαθμονομητής 0	CAL 1 • Calibrator 1 • Kalibrator 1 • Calibrateur 1 • Calibrador 1 • Calibratore 1 • Calibrador 1 • Kalibrator 1 • Kalibratorer 1 • Βαθμονομητής 1

CAL 2	CAL 3	CAL 4	CONJ
• Calibrator 2 • Kalibrator 2 • Calibrateur 2 • Calibrador 2 • Calibratore 2 • Calibrador 2 • Kalibrator 2 • Kalibratorer 2 • Βαθμονομητής 2	• Calibrator 3 • Kalibrator 3 • Calibrateur 3 • Calibrador 3 • Calibratore 3 • Calibrador 3 • Kalibrator 3 • Kalibratorer 3 • Βαθμονομητής 3	• Calibrator 4 • Kalibrator 4 • Calibrateur 4 • Calibrador 4 • Calibratore 4 • Calibrador 4 • Kalibrator 4 • Kalibratorer 4 • Βαθμονομητής 4	• Conjugate • Konjugat • Conjugué • Conjugado • Coniugato • Conjugado • Konjugat • Konjugat • Συζυγές
CONTROL –	**CONTROL +**	**CONTROL RF**	**SAMP DIL CONC A**
• Negative Control • Negativkontrolle • Contrôle Négatif • Control negativo • Controllo negativo • Controlo Negativo • Negativ kontroll • Negativ kontrol • Αρνητικός μάρτυρας	• Positive Control • Positivkontrolle • Contrôle Positif • Control positivo • Controllo positivo • Controlo Positivo • Positiv kontroll • Positiv kontrol • Θετικός μάρτυρας	• Reference Control • Referenzkontrolle • Sérum de Référence • Control de Referencia • Controllo di Riferimento • Controlo de Referência • Referenskontroll • Referencekontrol • Μάρτυρας αναφοράς	• Sample Diluent Concentrate A • Probendiluentkonzentrat A • Diluant concentré pour échantillons A • Diluyente de Muestras Concentrado A • Diluente Concentrato per Campioni A • Concentrado A de Diluente para Amostras • Provdiluentkoncentrat A • Prøvefortynderkoncentrat A • Συμπύκνωμα Α αραιωτικού δειγμάτων
MPLT	**STOP**	**SUBS**	**WSH BUF CONC**
• Microplate • Mikrotiterplatte • Microplaque • Microplaca • Micropiastra • Microplaca • Mikroplatta • Mikroplade • Μικροπλάκα	• Stop Solution • Stopplösung • Solution d'arrêt • Solución de parada • Soluzione bloccante • Solução de Paragem • Stopplösning • Stopopløsning • Ανασχετικό διάλυμα	• Substrate • Substrat • Substrat • Sustrato • Substrato • Substrato • Substrat • Substrat • Υπόστρωμα	• Wash Buffer Concentrate • Waschpufferkonzentrat • Solution de lavage concentrée • Tampón de Lavado Concentrado • Tampone di Lavaggio Concentrato • Concentrado de tampão de lavagem • Tvättbuffertkoncentrat • Vaskebufferkoncentrat • Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης

TABLA DE MATERIAS

Página

Uso al que está destinado.....Portada

Resumen y explicación.....2

Principios del procedimiento.....2

Información del producto.....3

Advertencias y precauciones.....5

Recolección de muestras y preparación.....6

Procedimiento.....7

Control de calidad.....10

Resultados.....11

Limitaciones del procedimiento.....13

Valores esperados.....14

Características específicas del funcionamiento.....17

Resumen del procedimiento.....19

Referencias.....20

RESUMEN Y EXPLICACION

La prueba anti-dsDNA es útil para el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico y también puede emplearse para observar los niveles de anticuerpos contra dsDNA en pacientes individuales durante períodos de tratamiento y de remisión de la enfermedad.

Una característica general de las enfermedades reumáticas sistémicas es la presencia de anticuerpos circulantes contra una variedad de antígenos celulares. La detección de dichos autoanticuerpos juega un papel primordial en el diagnóstico diferencial de enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoidea (AR) y la enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) (1,2). Los anticuerpos contra el dsDNA son muy específicos para el LES y se detectan con mucha frecuencia en pacientes no tratados que presentan la enfermedad en su forma activa (3). La Asociación Americana de Reumatismo ha incluido la presencia de anticuerpos contra dsDNA en el LES como uno de los criterios de clasificación de esta enfermedad (4). Más aún, varios investigadores han informado acerca de la existencia de una correlación entre la actividad de la enfermedad y las fluctuaciones en los niveles de anticuerpos (5,6). Por consiguiente, se considera que la observación de la actividad del dsDNA es útil en el manejo de los pacientes con LES (7).

Las pruebas ELISA son fáciles de realizar, sensibles, reproducibles y objetivas en comparación con otros métodos. Más aún, se pueden normalizar con base en la norma de referencia Wo/80 establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el anticuerpo anti-dsDNA (9).

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los micropozos están recubiertos con una preparación de DNA de timo de ternero. Durante la primera incubación, los autoanticuerpos específicos presentes en el suero o plasma diluido se unen al revestimiento antigénico. Luego se lavan los micropozos para eliminar los componentes séricos o plasmáticos no unidos. Un conjugado de anticuerpos monoclonales contra IgG e IgM humanas marcados con enzimas se fija a los anticuerpos unidos a la superficie durante la segunda incubación. Después de otro paso de lavado, se identifican los anticuerpos específicos mediante la incubación con el sustrato. La

adición de la solución de parada termina la reacción y proporciona el pH adecuado para que se revele el color. La cantidad de conjugado unido se mide en términos de unidades de absorbancia.

En el protocolo cuantitativo, se calcula la concentración de anticuerpo anti-dsDNA de una muestra desconocida haciendo una interpolación a partir de una curva de respuesta a la dosis que se basa en calibradores normalizados contra la Preparación de Referencia OMS Wo/80. Los resultados se registran como unidades internacionales (UI) por mililitro.

En el protocolo cualitativo, se compara la cantidad de conjugado que se une en presencia de la muestra desconocida con la que se une en presencia de una concentración conocida de anticuerpo anti-dsDNA en el control de referencia.

INFORMACION DEL PRODUCTO

96 determinaciones

Todos los reactivos, excepto el Tampón Concentrado de Lavado, del Diluyente Concentrado de la Muestra, y Control Negativo y Control Positivo vienen listos para usar. Todos los reactivos son estables hasta de caducidad que se indica en la etiqueta si se almacenan en las condiciones recomendadas (+2-8°C). La turbidez o precipitación de cualquier componente del kit es señal de inestabilidad y no se debe utilizar el componente.

R1: Microplaca: 12 x 8 tiras de micropocillos

Recubiertos con antígeno dsDNA (DNA de timo de ternero), cerradas herméticamente en un envase de aluminio con desecante. Los pozos individuales pueden separarse de cada banda de microtitulación. Guardar las tiras de micropocillos no usadas en una bolsa sellada con desecante dentro y almacenar a +2-8°C.

R2: Concentrado de Diluyente de Muestras A: [5X], 1 x 25 ml

Xn, Xi Búfer fosfatado, albúmina sérica bovina (BSA), Triton X-100 y 0,5% (c/v) azida sódica. Diluir vertiendo el contenido de un vial en un recipiente limpio y añadiendo 100 ml de agua destilada o desionizada. El diluyente de muestras diluido es estable hasta 6 meses a +2-8°C o hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del vial (la que sea inferior), siempre que se evite la contaminación microbiana.

R3: Búfer de Lavado Concentrada: [16X], 2 x 25 ml

Búfer boratado, Triton X-100 y 0,8% (c/v) azida sódica. Diluir vertiendo el contenido de un vial en un recipiente limpio y añadir 375 ml de agua destilada o desionizada. El tampon de lavado diluido es estable hasta 6 meses a +2-8°C o hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del vial (la que sea inferior), siempre que se evite la contaminación microbiana.

C0: Control Negativo: 1 x 130 µl

Plasma humano con < 0,1% (c/v) azida sódica. Diluir 1 al 100 del mismo modo que las muestras de los pacientes, por ejemplo: 10 µl a 1,0 ml de Diluyente de Muestras diluido.

C1: Control de Referencia: 1 x 1,5 ml

Plasma humano en búfer con < 0,1% (c/v) azida sódica. **LISTO PARA SU USO. NO NECESITA DILUIRSE.**

C2: Control Positivo: 1 x 230 µl

Plasma humano con 0,1% (c/v) azida sódica. Diluir 1 al 100 del mismo modo que las muestras de los pacientes, por ejemplo: 10 µl hasta 1,0 ml de Diluyente de Muestras diluido.

S0: Calibrador 0: 1 x 1,0 ml

Albúmina sérica bovina (BSA) en búfer con 0,1% (c/v) azida sódica, que contiene 0 IU/ml. **LISTO PARA SU USO. NO NECESITA DILUIRSE.**

S1-S4: Calibradores 1-4: 1,0 ml de cada uno

Plasma humano en búfer con < 0,1% (c/v) azida sódica, que contiene 10, 50, 150 y 300 IU/ml. **LISTO PARA SU USO. NO NECESITA DILUIRSE.**

R4: Conjugado IgG/IgM: 1 x 15 ml

Anticuerpo monoclonal de murina marcado con fosfatasa alcalina a IgG e IgM humana en búfer Tris con albúmina sérica bovina (BSA) y < 0,1% (c/v) azida sódica.

R5: Substrato: 1 x 15 ml

Ión magnesio 2+ como cofactor enzimático, monofosfato de fenolftaleína (PMP) y Bronidox al 10% en solución búfer. No exponer a la luz durante el almacenamiento. El sustrato debe tener un color amarillo pálido. El color rosa indica contaminación y hay que desechar el reactivo.

R6: Solución de Parada: 1 x 15 ml

Búfer con 5% de hidróxido de sodio 0,4N, sal de tetrasodio EDTA y carbonato de sodio, pH > 10.

Portatiras de micropocillos: 1

Bolsa sellada con desecante: 1

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para diagnóstico in vitro.
2. Material biologico de origen humano usados en la preparación de los reactivos han sido testados y encontrados no reactivos a antigeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (HCV), y anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 y HIV-2). Considerando que en la actualidad no existen métodos analíticos que garanticen la ausencia absoluta de agentes infecciosos, se recomienda manipular los reactivos así como las muestras de pacientes considerándolos transmisores potenciales de enfermedades infecciosas (12).
3. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al desechar los líquidos, añadir agua en abundancia para evitar la acumulación de azida (13).

4. PRODUCTOS PELIGROSOS:

Xn, Xi

R2 CONCENTRADO DE DILUYENTE DE MUESTRAS A (5X)

Nocivo, Irritante
Contiene azida sódica
R22-36-52/53, S26-36/37/39-46-61

Xn

R3 BÚFER DE LAVADO (16X)

Nocivo
Contiene azida sódica
R22-52/53, S26-36/37/39-46-61

Xi

R5 SUBSTRATO

Irritante
Contiene Bronidox
R36, S25-26-36/37/39

Xi

R6 SOLUCIÓN DE PARADA

Irritante

Contiene carbonato de sodio, sal tetrasodio EDTA e hidróxido sódico
R36/38, S25-26-36/37/39-45-60

C2 CONTROL POSITIVO

Nocivo

Contiene azida sódica

R22, S36

R22	Nocivo por ingestión.
R36	Irrita los ojos.
R36/38	Irrita los ojos y la piel.
R52/53	Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.
S25	Evítese el contacto con los ojos.
S26	En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
S36	Úsese indumentaria protectora adecuada.
S36/37/39	Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
S45	En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).
S46	En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.
S60	Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.
S61	Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.

RECOLECCION DE MUESTRAS Y PREPARACION

El suero o plasma son las muestras recomendadas. No utilice muestras lipémicas, hemolizadas o turbias. Las muestras se pueden almacenar a +2-8°C hasta 5 días, o hasta 4 semanas a -20°C. Mezcle completamente las muestras descongeladas antes de hacer el análisis y evite congelarlas y descongelarlas en forma repetida. No se deben someter al proceso de inactivación térmica, ya que esto puede producir resultados falsos positivos.

PROCEDIMIENTO

Material suministrado

R1: Microplaca para
R2: Concentrado de Diluyente de Muestras A
R3: Búfer de Lavado Concentrado
S0-S4: Calibradores
C0: Control Negativo
C1: Control de Referencia
C2: Control Positivo
R4: Conjugado IgG / IgM
R5: Substrato
R6: Solución de Parada
Portatiras de micropocillos
Bolsa sellada con desecante

Material necesario pero no suministrado

1. Lector de placa o tira de 96 pocillos con filtro de 550 nm. Los filtros en el rango 540-565 nm proporcionan resultados aceptables.
2. Pipetas de precisión capaces de administrar 10 µl, 100 µl y 1,0 ml.
3. Pipeta automática de 100 µl.
4. Lavador de placas automático o pipeta automática de 200 µl.
5. Cronómetro para determinar intervalos de 30 y 60 minutos.
6. Probetas de plástico o de vidrio de 100 y 400 ml.
7. Toallas de papel absorbente.
8. Agua destilada o desionizada.
9. Recipientes o tubos adecuados (1 ml) para la dilución de las muestras.

Opcional: Una lectura de longitud de onda dual puede realizarse con un filtro de 550 nm y un filtro de referencia en el rango 620 - 630 nm.

Comentarios sobre el procedimiento

1. Con el fin de obtener resultados fiables y coherentes, ajustarse estrictamente a las instrucciones de este documento. No modificar las condiciones de almacenaje y de manejo de los reactivos del kit ni de las muestras de los pacientes.

2. No mezclar las tiras recubiertas o los reactivos de diferentes números de lote. No utilizar los reactivos fuera de la fecha de caducidad indicada.
3. Debe evitarse la contaminación de los reactivos. Utilizar una punta de pipeta desechable limpia y nueva para la manipulación de cada reactivo o muestra de paciente.
4. Asegurarse de que todas las tiras se encuentran bien sujetas al portatiras de pocillos. Guardar el portatiras de pocillos para usos posteriores.
5. Las muestras de los pacientes, Controles y Calibradores deben adicionarse de forma continua. El tiempo que dure el proceso de adición de principio a fin no debe exceder de 15 minutos. Para obtener resultados óptimos utilizar pipetas de repetición o pipetas multicanal para la adición de los reactivos corrientes.
6. **NO CONGELAR LOS KITS.**

Procedimiento

1. Como mínimo 30 minutos antes de utilizarlos llevar todos los reactivos y los envases de aluminio de las microplacas a temperatura ambiente (+18-25°C). Mezclar los reactivos invirtiéndolos suavemente.
2. Calcule el número de bandas de vasos necesario para el análisis y colóquelas en el soporte para bandas. Si solamente se necesita un vaso o menos de 8 vasos, puede sacarse la cantidad exacta de vasos, retirando la banda de plástico del soporte para placas. Retire la banda de vasos del soporte para bandas de plástico tirando de la parte inferior de los vasos. Puede arrancarse la cantidad necesaria de vasos y volverse a colocar en la banda de plástico. Vuelva a colocar la banda de plástico en el soporte para placas de microtitulación abisagrando primero el orificio rectangular en el borde inferior (fila H) de la ranura del soporte y asegurándose de que el orificio cuadrado, que tiene la muesca en el lateral izquierdo, está bien sujeto en el borde superior (fila A). Devuelva el material no utilizado a la bolsa resellable con desecante y devuelva ésta a la bolsa de papel metalizado. Consérvelo a entre 2 y 8°C.
3. Diluya la solución de lavado concentrada y el diluyente concentrada de muestras. Mezcle completamente.

4. Diluir las muestras experimentales y los Controles Positivo y Negativo del 1 al 100; por ejemplo: dispensar 1,0 ml de Diluyente de Muestras diluido en un envase adecuado y añadir 10 µl de la muestra. Mezclar bien. Todas las diluciones de las muestras deben realizarse inmediatamente antes de su utilización en el ensayo.
5. Marque los micropozos para permitir la identificación de las muestras de los pacientes y de los controles o los calibradores.
6. Utilizando la pipeta, coloque por duplicado en los micropozos apropiados:
   a. 100 µl de control de referencia para la prueba cualitativa.
   b. 100 µl de cada calibrador S0-S4 para la prueba cuantitativa.
7. Utilizando la pipeta, coloque 100 µl de cada muestra de paciente **prediluida** y los controles positivos y negativos en los pozos restantes.
8. Incube durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente (+18-25°C).
9. Aspire o invierta la placa sobre un lavabo adecuado para desechar materiales biológicos. Si invierte la placa, golpéela firmemente sobre papel absorbente varias veces para eliminar el exceso de líquido.
10. Lave las placas 3 veces con una pipeta automática o con un lavador de placas, utilizando un mínimo de 200 µl de solución tampón de lavado diluida por cada pozo. Aspire o decante el líquido invirtiendo rápidamente la placa sobre el lavabo. Si invierte la placa, golpéela firmemente sobre papel absorbente varias veces para eliminar el exceso de líquido.
11. Agregue 100 µl de conjugado a cada pozo.
12. Incube durante 30 ± 5 minutos a temperatura ambiente (+18-25°C).
13. Repita el paso 9.
14. Repita el paso 10.
15. Agregue 100 µl de sustrato a cada pozo utilizando las mismassecuencias de pipeteo que en el paso 11.
16. Incube durante 30 ± 5 minutos a temperatura ambiente (+18-25°C).
17. Añadir 100 µl de la Solución de Parada a cada pocillo siguiendo la misma secuencia que se siguió en el paso 12. Golpear la placa suavemente para mezclar bien los contenidos de cada pocillo.
18. Leer los pocillos con un lector de placas antes de una hora.

CONTROL DE CALIDAD

Para asegurar la validez de los resultados en cada análisis, cada laboratorio deberá incluir Controles Positivo y Negativo en cada placa.

Cuando los controles no cumplan las especificaciones descritas, el análisis no es válido y los resultados de las muestras de los pacientes no deben ser comunicados. El/la usuario/a puede decidir si repite el análisis, en caso de haber revisado el procedimiento que siguió, o bien puede contactar con el disfabricante. Si se llevara a cabo una repetición del análisis, deberá prepararse una nueva dilución de cada control.

Ensayo Cualitativo

Debe incluirse el Control de Referencia Anti-dsDNA, que se suministra listo para su utilización, en todos los ensayos. Se recomienda ensayar el Control de Referencia por duplicado.

1. El índice de la media $\frac{\text{Valor de aborbancia del Control Negativo}}{\text{Valor de absorbancia del Control de Referencia}}$ debe ser inferior a 0,95.
2. El índice de la media $\frac{\text{Valor de aborbancia del Control Positivo}}{\text{Valor de absorbancia del Control de Referencia}}$ debe ser el fijado en la etiqueta del Control Positivo.
3. La densidad óptica del control de referencia debe ser 0,1 unidades de absorbancia. Si la densidad óptica del control de referencia es < 0,1 unidades de absorbancia, el ensayo no será válido y no se darán por válidos los resultados obtenidos con las muestras de los pacientes.

Ensayo Cuantitativo

Cada ensayo de Anti-dsDNA de Kallestad™ deberá considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados.

1. La concentración del control negativo < 30 UI/ml.
2. El rango esperado aceptable para el Control Positivo debe estar comprendido entre los valores impresos en la etiqueta del vial.

Conservantes, con azida de sodio al 0,1% (p/v), por lo que no afectará a los resultados de las muestras.

RESULTADOS

Ensayo Cualitativo

Debe calcularse el índice de unidad de absorbancia (densidad óptica) para cada muestra de la siguiente manera:

$$\text{Ind. de absorbancia} = \frac{\text{Valor de absorbancia de la muestra}}{\text{Valor de absorbancia del Control de Referencia}}$$

Se recomienda a los usuarios del Anti-dsDNA de Kallestad™ que determinen un valor de ratio para su población de pacientes que proporcione una discriminación óptima entre las muestras negativas y positivas.

Conciente de absorbancia	Interpretación de los resultados
< 0,95	Negativos
0,95 à 1,0	Resultado en los limites. Se recomienda reptir el ensayo. Si el resultado es todavia equivoco después de repetir el ensayo, se deberá obtener una nueva muestra después de un intervalo de tiempo adecuado.
> 1,0	Positivo

Se recomienda volver a analizar los ensayos que den un resultado positivo, utilizando el protocolo cuantitativo.

Ensayo Cuantitativo

Se recomienda que los usarios de Anti-dsDNA de Kallestad™ establezcan márgenes normales para la población que acude a sus laboratorios.

Cada ensayo de Anti-dsDNA de Kallestad™ deberá considerarse por separado al calcular e interpretar los resultados.

Calcule el valor medio de absorbancia de cada calibrador (ver Tabla 1) y trácelo en un gráfico como función de la concentración del calibrador log (10) en papel milimetrado. De esta manera, es posible leer las concentraciones de las muestras a partir de la curva de los calibradores. La Figura 1 muestra un gráfico típico. La Figura 1 sólo sirve de referencia y no debe utilizarse para interpretar los resultados.

Una alternativa consiste en utilizar un programa adecuado de ordenador para diseño de curvas. (Se pueden emplear, por ejemplo, los diseños de curvas logísticas de 4 parámetros o log/logit).

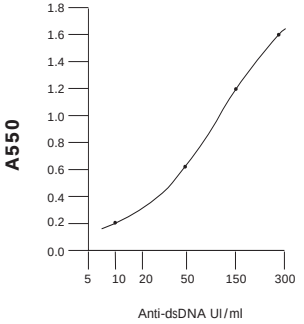
Las muestras con absorvancias superior del calibrador están fuera del rango del ensayo y deben ser consideradas como > 300 UI/ml. Dichas muestras pueden diluirse según una dilución adicional de 1/10 se recomienda. Al calcular los resultados para cualquier muestra que haya sido diluida adicionalmente, es necesario corregir la concentración obtenida por dicho factor de dilución. (Por ejemplo, si se diluye una muestra 1/10, la concentración obtenida deberá multiplicarse por 10).

Es necesario tener en cuenta que en cualquier análisis para medir un anticuerpo lo que se determina no es la concentración de éste, sino su actividad en la muestra. Esta se ve afectada por diversos parámetros como la avidez del anticuerpo.

Tabla 1: Calibradores del Anti-dsDNA

Calibradores	UI/ml	Calibradores	UI/ml
S0	0	S3	150
S1	10	S4	300
S2	50		

Figura 1: Curva Tipica de Calibradores



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Aunque la presencia de altos títulos de anticuerpos contra el antígeno dsDNA es indicativa de lupus eritematoso sistémico, es necesario considerar los datos a la luz de otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
2. Algunos individuos pueden tener altos niveles de anticuerpos anti-dsDNA con poca o ninguna evidencia de enfermedad clínica. En contraste, algunos pacientes con LES pueden tener niveles no detectables de estos anticuerpos.
3. Las muestras de suero o plasma que contengan niveles muy altos del anticuerpo pueden dar absorbancias mayores que el estándar superior. Dichas muestras deberán diluirse más con diluyente de muestras y volverse a analizar.
4. Aunque en el lupus eritematoso sistémico predominan los anticuerpos IgG anti-DNA, se pueden encontrar anticuerpos IgM junto con los IgG en algunas muestras. Es posible que las muestras que contengan altos niveles de IgM y bajos niveles de IgG no produzcan resultados positivos en las pruebas que miden únicamente anticuerpos IgG (11). El análisis Kallestad™ de anti-dsDNA ha sido diseñado para detectar tanto IgG como IgM contra dsDNA.

5. Cuando se utiliza el análisis Anti-dsDNA de Kallestad™ para examinar los niveles de anticuerpos, es aconsejable emplear el mismo tipo de muestra (suero o plasma) a lo largo de todo el período de estudio.

VALORES ESPERADOS

Ensayo Cualitativo

Se recomienda a los usuarios del Anti-dsDNA de Kallestad™ que determinen un valor de ratio para su población de pacientes que proporcione una discriminación óptima entre las muestras negativas y positivas.

Conciente de absorbancia	Interpretación de los resultados
< 0,95	Negativos
0,95 à 1,0	Resultado en los limites. Se recomienda reptir el ensayo. Si el resultado es todavia equivoco después de repetir el ensayo, se deberá obtener una nueva muestra después de un intervalo de tiempo adecuado.
> 1,0	Positivo

Se recomienda volver a analizar los ensayos que den un resultado positivo, utilizando el protocolo cuantitativo.

Ensayo Cuantitativo

La tabla siguiente debe emplearse únicamente como guía de interpretación. Se recomienda que los usuarios de la prueba anti-dsDNA de Kallestad™ establezcan márgenes para las poblaciones que acuden a sus laboratorios.

Tabla 2: Valores esperados

Margen de anti-dsDNA (UI/ml)	Interpretación
< 30	Valores negativos para anticuerpos contra dsDNA.
30 - 50	Valores limítrofes para anticuerpos contra dsDNA. Es posible que haya lupus eritematoso sistémico u otra enfermedad del tejido conectivo. Considere otras pruebas para hacer el diagnóstico diferencial (v.g., análisis anti-Sm de Kallestad™) y repita las de anti-dsDNA en una muestra subsiguiente.
> 50 - 300	Valores positivos para anticuerpos contra dsDNA. Es probable que haya lupus eritematoso sistémico.
> 300	Valores muy positivos para anticuerpos contra dsDNA. Altamente diagnósticos de lupus eritematoso sistémico.

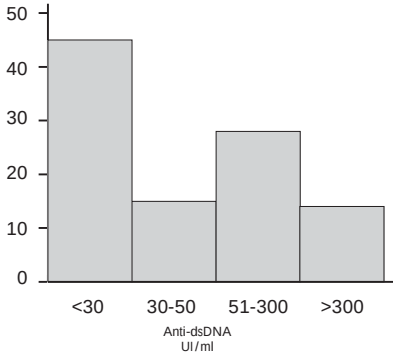
Muestras Normales

Se examinaron ciento noventa y dos (192) muestras séricas de individuos asintomáticos con la prueba anti-dsDNA de Kallestad™. El valor de corte negativo se definió como el valor promedio más dos desviaciones estándar y se calculó en 30 UI/ml. Ciento noventa (190) muestras (el 99%) fueron negativas para los anticuerpos contra dsDNA utilizando este valor.

Muestras de LES

Se obtuvieron doscientas cincuenta y siete (257) muestras de suero de pacientes con LES clínicamente comprobado. De ellas, 142 (el 55%) fueron positivas con la prueba anti-dsDNA de Kallestad™. La figura 2 ilustra la frecuencia global de distribución de los anticuerpos anti-dsDNA en estos pacientes con LES.

Figura 2: % de pacientes con LES



Muestras de otras enfermedades diferentes a LES

Se midieron los niveles de anticuerpos anti-dsDNA en una variedad de enfermedades diferentes al lupus eritematoso sistémico. Los datos obtenidos se esbozan a continuación:

Tabla 3: Muestras de pacientes con otras enfermedades

Enfermedad	Negativas (0 - 30 UI/ml)	Positivas débiles > (30 - 50 UI/ml)	Positivas > (51 - 300 UI/ml)
Artritis Reumatoidea	32	2	1
Polimiositis	22	1	—
Síndrome de Sjögren	25	1	—
Infecciones virales	27	1	—
Hipergamma-globulinemia	6	1	—

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DE FUNCIONAMIENTO

Recuperacion

Se analizaron cuatro diluciones de cuatro muestras de pacientes en tres análisis separados de anti-dsDNA Kallestad™ utilizando 3 lotes diferentes. La Tabla 4 muestra los valores promedio obtenidos en UI/ml así como el porcentaje de recuperación.

Tabla 4: Características de dilución

Muestra	Dilución	Valor promedio (UI/ml)	Recuperación (%)
1	A	171,3	100
	A/2	79,5	93
	A/4	39,8	93
	A/8	19,7	92
2	A	486,6	100
	A/2	210,9	87
	A/4	116,3	96
	A/8	57,6	95
3	A	146,4	100
	A/2	67,1	92
	A/4	33,3	91
	A/8	18,1	99
4	A	153,9	100
	A/2	89,1	116
	A/4	44,6	116
	A/8	26,5	137

Precisión

Se determinó la precisión intraensayo analizando 3 controles iferentes, con reproducción de 12.

Tabla 5: Precisión Intraensayo

Control	Valor Promedio (UI/ml)	% CV
1	22,4	6,0
2	66,9	4,6
3	104,6	4,5

Se determinó la precisión interensayo analizando 3 controles diferentes en un total de 50 análisis. Los resultados fueron obtenidos por cinco técnicos diferentes con tres lotes diferentes de análisis Kallestad™ de anti-dsDNA.

Tabla 6: Precisión Interensayo

Control	Valor Promedio (UI/ml)	% CV
1	22,2	8,7
2	65,3	9,1
3	105,2	8,1

Correlation

Se hicieron análisis paralelos en un grupo de 338 sueros (100 muestras normales y 238 de pacientes con LES confirmado) utilizando el análisis Kallestad™ de anti-dsDNA y otra prueba ELISA (Prueba A). Para el análisis Kallestad™ se empleó un valor de corte de 50 UI/ml y para la Prueba A, uno de 80 UI/ml (excluyendo los positivos débiles según fueran definidos por ambas pruebas). Se obtuvo una buena correlación entre el análisis anti-dsDNA de Kallestad™ y tanto el radioinmunoanálisis de Farr como el análisis de inmunofluorescencia con Crithidia luciliae.

Tabla 7: Correlación con el EIA Kallestad™ de anti-dsDNA en Microplacas

	EIA Kallestad™ de anti-dsDNA en microplacas		
	(+)	(–)	Total
Prueba A (+)	93	12	105
(–)	7	226	233
Total	100	238	338

Concordancia general = 94%

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

1. Añadir 100 µl Control de Reference y/o Calibradores por duplicado. Añadir 100 µl de la muestra diluida, Controles Positivos y Negativos diluidos a los micropocillos numerados de la tiras de pocillos.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 60 ± 5 minutos.
3. Lavar las tiras de pocillos 3 veces.
4. Añadir 100 µl de Conjugado a cada pocillo.
5. Incubar a temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos.
6. Lavar las tiras de pocillos 3 veces.
7. Añadir 100 µl de Solución Substrato a cada pocillo.
8. Incubar las tiras a temperatura ambiente durante 30 ± 5 minutos.
9. Añadir 100 µl de Solución de Parada a cada pocillo.
10. Leer la absorbancia a 550 nm.

BIO-RAD

Bio-Rad Laboratories

Clinical Diagnostics Group

4000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547
Telephone (510) 724-7000
FAX (510) 741-5824
www.bio-rad.com

AUSTRALIA *Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd. Unit 1 Block Y, 391 Park Road, Regents Park NSW 2143*
Phone 61-2-9914-2000 • Telefax 61-2-9914-2868

AUSTRIA *Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 8B/3-6, A-1130 Vienna*
Phone 43-1-877-8901 • Telefax 43-1-8/6-a629

BELGIUM *Bio-Rad S.A. N.V. Begoniastraat 5, B-9810 Nazareth Eke*
Phone 32-9-385-5511 • Telefax 32-9-385-6554

BRAZIL *Bio-Rad do Brasil, Rua dos Invalidos 212, 5 Andar, Lapa CEP 20231-020, Rio de Janeiro*
Phone 5521 3461 5202 • Telefax 5521 2224-6524

CANADA *Bio-Rad Laboratories, Ltd., 2403 Guenette Montreal, Québec H4R2E9*
Phone 1-514-334-4372 • Telefax 1-514-334-4415

CZECH REPUBLIC *Bio-Rad spol. s.r.o., Nad ostrovem 1110/7, 147 00 Prague 4*
Phone 420-2-41430532 • Telefax 420-2-41431042

CHINA *Bio-Rad China Limited, B&D Hai Li Building, No. 88 Da Pu Road, Shanghai 200023*
Phone 86-21-63052255 • Telefax 86-21-53944775

DENMARK *Bio-Rad Laboratories, Generatorvej 6 C, 2730 Herlev*
Phone 45-4452-1000 • Telefax 45-4452-1001

FINLAND *Bio-Rad Laboratories, Pihatorma 1 A, FIN-02240 Espoo*
Phone 358-9-804-22-00 • Telefax 358-9-804-11-10

FRANCE *Bio-Rad S.A., 3 Boulevard Raymond Poincaré 92430 Marnes-la-Coquette*
Phone 33-1-4796-9600 • Telefax 33-1-4741-9133

GERMANY *Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstrasse 164, D-80939 Munich*
Phone 49-89-318040 • Telefax 49-89-316-84100

HONG KONG *Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F, DCH Commercial Centre, 25 Westlands Road, Quarry Bay • Phone 852-2789-3300 • Telefax 852-2789-1290*

INDIA *Bio-Rad Laboratories (India) Pte. Ltd., 3A01, Tiffany Towers, Vanitya Nikunj, Unthyng Vihar, Phase-V, Gurgaon, 122016 Haryana • Phone 91-124-6398112• Telefax 91-124-6398115*

ISRAEL *Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Homa Street, New Industrial Area, Rishon Le Zion 75656*
Phone 972 3 9514127 • Telefax 972 3 9514120

ITALY *Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini 18/A, 20090 Segrate, Milan*
Phone 39-02-216091 • Telefax 39-02-21609-398

JAPAN *Nippon Bio-Rad Laboratories, 7-18, Higashi-Nippori 5-chome, Arakawa-ku, Tokyo 116-0014*
Phone 81-3-5811-0290 • Telefax 81-3-5811-0282

KOREA *Bio-Rad Korea Ltd., R1, Cambridge Building, 1461-15, Seocho-Dong, Seocho-Gu, Seoul, 137-070 • Phone 82-2-3473-4460 • Telefax 82-2-3472-7003*

LATIN AMERICA *Bio-Rad Latin America, 1414O Palmetto Frontage Road, Suite 101, Miami Lakes, Florida 33016*
Phone 305-894-5950 • Telefax 305-894-5960

MEXICO *Bio-Rad Laboratorios Mexico, S.A. de C.V., Adolfo Prieto No 1653, Colonia Del Valle, 03100 Mexico, D.F. • Phone 5255-5534-2552 • Telefax 5255-5524-5555*

THE NETHERLANDS *Bio-Rad Laboratories BV, Fokkerstraat 10, 3905 KV Veenendaal*
Phone 31-318-540666 • Telefax 31-318-542216

NEW ZEALAND *Bio-Rad New Zealand, 189 Bush Road, Albany, Auckland*
Phone 64-9-415-2280 • Telefax 64-9-415-2284

NORWAY *Bio-Rad Laboratories, Johan Scharffenbergs vei 91, N-0694, Oslo*
Phone 47-23-38-41-30 • Telefax 47-23-38-41-39

POLAND *Bio-Rad Laboratories, Naklelska Str. 3, 01106 Warsaw*
Phone 48-22-331-99-99 • Telefax 48-22-331-99-98

PORTUGAL *Bio-Rad Laboratories, Rua do Entreposto Industrial, 3-1º Esq., 2724 - 513, Amadora*
Phone 351 21-472 7700 • Telefax 351 21-472 7777

RUSSIA *Bio-Rad Laboratories Ltd., 37/A14 Leningradsky Pr., 125167 Moscow*
Phone 7-095-721-14-00 • Telefax 7-095-721-14-12

SINGAPORE *Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 27 International Business Park, #01-02, 609924 • Phone 65-6415-3188 • Telefax 65-6415-3189*

SOUTH AFRICA *Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Rolton Road, Parkwood, Johannesburg 2193*
Phone 27-11-442-85-08 • Telefax 27-11-442-85-25

SPAIN *Bio-Rad Laboratories S.A., Miniparc II, Edificio M, C/ Caléndula 95,*
El Soto de la Moraleja, 28109 Madrid • Phone 34-91-590-5200 • Telefax 34-91-590-5211

SWEDEN *Bio-Rad Laboratories A.B., Vintergatan 1, Box 1097, S-172 22, Sundbyberg*
Phone 46-8-555-127-00 • Telefax 46-8-555-127-80

SWITZERLAND *Bio-Rad Laboratories, Nenningerweg 2, CH-4153 Reinach BL*
Phone 41-61-717-95-55 • Telefax 41-61-717-95-50

THAILAND *Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini I Bldg., 239/2 Rajdamri Rd., Lumpini, Pathumwan, Bangkok 10330 • Phone 662-651-8011 • Telefax 662-651-8012*

UNITED KINGDOM *Bio-Rad Laboratories Ltd., Bio-Rad House, Maylands Ave., Hemel Hempstead, Herts HP2 7TD*
Phone 44-208-328-2000 • Telefax 44-208-328-2500

Effective Date: octubre 2004

August 2004